


**Production of tetraacetylphytosphingosine for use in cosmetics using a *Pichia ciferrii* strain**

**Patent number:** FR2781502  
**Publication date:** 2000-01-28  
**Inventor:** CHOI WOO SEOK; JEONG JI HEAN; HONG SUNG YONG; PARK CHANG SEO  
**Applicant:** DOOSAN TRAINING & TECHNOLOGY C (KR)  
**Classification:**  
- international: C12N1/16  
- european: C12P13/00, C12R1/84  
**Application number:** FR19980009516 19980724  
**Priority number(s):** FR19980009516 19980724; US19980119958 19980721

**Also published as:** US5958742 (A1)**Abstract of FR2781502**

A process for the production of tetraacetylphytosphingosine (TAPS) using *Pichia ciferrii* strain DSCC 7-25 (KCCM-10131), is new. A process for the production of tetraacetylphytosphingosine (TAPS) using *Pichia ciferrii* strain DSCC 7-25 (KCCM-10131) comprises: (1) fermentation with the yeast strain until maximum concentration of TAPS in fermentation medium becomes 5-15 g/L, where: (a) the composition of YMgl medium comprises yeast extract, malt extract, peptone, glycerol containing CaCl<sub>2</sub> and citrate; (b) the temperature of cultivation is 22-28 deg C; and (c) the agitation speed of the medium is 400-600 rpm; (2) transferring the fermentation mass to an aging tank; (3) separating the TAPS using organic solvent; and (4) purifying the TAPS by silica gel chromatography.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 781 502**

②① N° d'enregistrement national : **98 09516**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : C 12 N 1/16 // (C 12 N 1/16, C 12 R 1:84)

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 24.07.98.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 28.01.00 Bulletin 00/04.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : DOOSAN TRAINING & TECHNO-  
LOGY CENTER — KR.

⑦② Inventeur(s) : PARK CHANG SEO, JEONG JI HEAN,  
HONG SUNG YONG et CHOI WOO SEOK.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET HARLE ET PHELIP.

⑤④ PROCÉDE MICROBIOLOGIQUE DE PREPARATION DE SPHINGOLIPIDES UTILISANT UNE NOUVELLE  
LEVURE PICHIA CIFERRII DSCC 7-25.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé microbio-  
logique de préparation de sphingolipides, en particulier, de  
tétraacétylphosphatidylcholine (TAPS), qui utilise une nouvel-  
le cellule de levure *Pichia ciferrii* DSCC 7-25 dans des con-  
ditions optimales de fermentation. En outre, cette invention  
concerne une nouvelle cellule de levure *Pichia ciferrii* DSCC  
7-25 et son procédé d'isolement à partir de la souche de *Pi-  
chia ciferrii* de type sauvage.

FR 2 781 502 - A1



La présente invention concerne un procédé microbiologique de préparation de sphingolipides, en particulier, de tétraacétylphytosphingosine (TAPS), utilisant une nouvelle levure Pichia ciferrii DSCC 7-25 dans des conditions de fermentation définies. De plus, cette invention concerne une  
5 nouvelle levure Pichia ciferrii DSCC 7-25 et son procédé d'isolement à partir de la souche parentale de Pichia ciferrii ATCC 14091.

Le terme "sphingolipides" désigne un groupe de lipides dérivés de sphingosine. De plus, les sphingolipides contiennent de la sphingosine, de la dihydrosphingosine ou de la phytosphingosine sous forme d'une base liée  
10 par une liaison amide à un acide gras. Les bases sphingosine et phytosphingosine peuvent être utilisées comme substances de départ dans la synthèse d'un groupe particulier de sphingolipides, à savoir, les céramides. Les céramides constituent le composant lipidique principal de la couche cornée, qui assure une fonction importante de barrière. Par conséquent, les  
15 produits cosmétiques pour la peau contenant des céramides ont pour fonction de conférer des propriétés de rétention d'eau à la peau.

Actuellement, les préparations hétérogènes de sphingolipides pour des produits cosmétiques sont principalement extraites à partir de sources d'origine animale. De toute évidence, il s'agit là d'un procédé relativement  
20 coûteux à l'échelle industrielle. De plus, il s'est avéré que ces substances sont potentiellement dangereuses en raison, par exemple, de la présence éventuelle d'encéphalomyélite spongiforme bovine (BSE) dans le tissu bovin. Ainsi, l'industrie cosmétique a manifesté un intérêt croissant pour de nouvelles sources de sphingolipides purs, bien définis, qui sont obtenus à  
25 partir de sources autres que les tissus animaux.

Il s'est avéré que des micro-organismes tels que les levures Pichia ciferrii, anciennement appelées Hansenula ciferrii et Endomycopsis ciferrii (Stodola et Wickerham, 1960; Wickerham et Stodola, 1960; Wickerham et coll., 1954; Wickerham, 1951), produisent des sphingolipides en tant que  
30 tels, ainsi que de la sphingosine, de la phytosphingosine et/ou leurs dérivés. Cette découverte fournit des sources de sphingolipides proprement dits et des substances de départ pour la production d'autres composés d'intérêt commercial qui pourraient offrir une alternative intéressante à l'utilisation de sources animales de ces composés.

La voie de biosynthèse de la tétraacétylphytosphingosine (TAPS) dans Pichia ciferrii a été décrite par Barenholz et coll. (1973). La voie de biosynthèse de la sphingosine et de la dihydrosphingosine est proposée par Dimari et coll. (1971). Barenholz et coll. (1971 & 1973) ont étudié le  
5 contexte métabolique de la production de TAPS et d'autres bases sphingolipidiques dans quatre souches de Pichia ciferrii. Dans cette dernière étude, les profils de quatre enzymes microsomales spécifiques de la biosynthèse de bases acétylées de sphingosine d'un faible producteur (Pichia ciferrii NRRL Y-1031, E-11, sexe b, 8-20-57) et d'un grand producteur  
10 (Pichia ciferrii NRRL Y-1031, F-60-10) ont été comparés. Il s'est avéré que l'activité spécifique de la 3-cétodihydrosphingosine-synthétase et de la base à chaîne longue-acétyl-CoA-acétyltransférase a été respectivement multipliée par 5-10 et par 30, par rapport au faible producteur, alors que les activités de la palmityl-thiokinase et de la 3-cétodihydrosphingosine-  
15 réductase étaient similaires. Ceci indique que dans le faible producteur, l'activité de la 3-cétodihydrosphingosine-synthétase et de la base à chaîne longue-acétyl-CoA acétyltransférase constitue les étapes limitantes de la synthèse de sphingosines acétylées. Dans les conditions de croissance définies, il s'est avéré que Pichia ciferrii NRRL Y-1031 F-60-10 produit 300  
20 µmoles/L de bases sphingosine (environ 0,15 g/l), dont au moins 250 µmoles/L étaient extracellulaires. Même lorsque les conditions de cultures ont été optimisées pour la production de TAPS, seul 0,485 g/l de TAPS (0,024 g de TAPS/g de levure sèche) a été obtenu (Maister et coll., 1962).

En utilisant la souche de groupe d'appariement F-60-10, Maister a  
25 réussi à produire jusqu'à 300 g/l, dans une fermentation par lots, à l'échelle pilote, en utilisant le glucose comme source de carbone, à 25°C. La TAPS produite est le D-D-érythroisomère, qui a la même stéréochimie que la phytosphingosine présente dans la peau humaine. La TAPS peut être facilement désacétylée en phytosphingosine. Cependant, les rendements en  
30 TAPS sont trop faibles pour avoir un quelconque intérêt pratique dans la production industrielle.

Récemment, de nombreux chercheurs ont tenté d'améliorer la productivité en sphingolipides en utilisant des cellules mutantes de Pichia ciferrii. Selon la description de WO 94/10131 (PCT/GB93/02230), une  
35 production maximale de 2700 mg/l de TAPS a été rapportée en utilisant

Pichia ciferrii NRRL Y-1031 F-60-10 dans une fermentation par lots avec une productivité en TAPS de 22.5 mg/l/h. En outre, dans WO 95/12683 (PCT/EP94/03652), des mutants dérivés de la souche de groupe d'appariement de Pichia ciferrii F-60-10 présentaient une augmentation de la productivité en TAPS de 40-60% par rapport à la souche parentale. D'autre part, EP 0 688 871 A2 décrivait la sélection et l'isolement d'un nouveau mutant de Pichia ciferrii F-60-10. A l'aide de ce mutant, il a été rapporté une production moyenne de TAPS de 500-1000 mg/l et une production maximale de 5000 mg/l alors même que la productivité en TAPS n'est que de 30-42 mg/l/h.

Toutefois, aucune des souches de levure étudiées à ce jour, même Pichia ciferrii NRRL Y-1031 F-60-10, ne produit de quantité suffisante de bases sphingolipidiques, telles que la sphingosine, la phytosphingosine ou leurs dérivés, pour pouvoir constituer une source efficace, intéressante sur le plan économique, pour ces composés.

Selon les premières études de Wickerham et de ses collaborateurs (Wickerham et Stodola, 1960), la production de sphingolipides, en particulier de TAPS, est liée à la sexualité des souches de Pichia ciferrii. Un groupe d'appariement NRRL Y-1031, F-60-10 fortement producteur de TAPS était l'un des isolats de groupe d'appariement dérivés de la souche parentale NRRL Y-1031 (ATTC 14091) qui était diploïde. Ils ont également signalé qu'un groupe d'appariement d'un sexe (a) avait tendance à produire beaucoup plus de TAPS que l'autre sexe (b). Il semblerait, toutefois, qu'il existe un ou plusieurs facteurs génétiques autres que la sexualité qui affectent la production de sphingolipides. Le groupe d'appariement 11 de la souche Y-1031 produisait beaucoup moins de TAPS que le groupe d'appariement F-60-10 de la souche Y-1031 bien qu'il avait le même sexe que le groupe d'appariement F-60-10.

En se basant sur les précédentes découvertes décrites ci-dessus, on a déduit que les recombinaisons génétiques durant la méiose d'un Pichia ciferrii diploïde, qui conduit à la formation de spores haploïdes, pourraient engendrer une nouvelle souche de Pichia ciferrii de groupe d'appariement haploïde ayant un rendement de production de TAPS plus élevé que le groupe d'appariement F-60-10. De plus, on a employé un schéma de sélection qui favorise l'isolement de grand producteur de TAPS à partir des

groupes de spores. Il a été démontré que l'ion calcium influe sur la biosynthèse des sphingolipides en modulant l'activité des enzymes clés impliquées dans la voie. Une déplétion des ions calcium par addition d'EGTA qui chélate les ions calcium dans le milieu de sélection empêche  
5 les cellules de levure de croître, probablement en raison du fait qu'elle empêche la synthèse de sphingolipides dans la cellule. Par conséquent, de nouveaux isolats haploïdes qui peuvent croître dans ces environnements de sélection sont des grands producteurs possibles de TAPS.

Le but de la présente invention est de fournir de nouveaux isolats de  
10 Pichia ciferrii, qui ont été déposés auprès du Korean Culture Center of Microorganism sous le numéro d'ordre KCCM-10131 le 30 juin 1998 conformément au traité de Budapest, pour préparer de la tétraacétylphytosphingosine (TAPS) avec une productivité élevée.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé  
15 permettant une production maximale de TAPS en utilisant un nouveau isolat, Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131), ledit procédé comprenant les étapes de:

- i) fermentation avec la souche de levure jusqu'à ce que la concentration maximale de TAPS dans le milieu de fermentation  
20 atteigne 5~15 g/l, dans laquelle
  - a) la composition du milieu YMgl comprend de l'extrait de levure, de l'extrait de malt, de la peptone, du glycérol contenant du  $\text{CaCl}_2$  et du citrate;
  - b) la température de culture est de 22~28°C;
  - 25 c) la vitesse d'agitation du milieu est de 400~600 tours/min;
- ii) transfert de la masse de fermentation dans une cuve de vieillissement;
- iii) séparation de la TAPS à l'aide de solvant organique; et
- iv) purification de la TAPS par chromatographie sur colonne de gel  
30 de silice.

L'autre but de la présente invention consiste à fournir le procédé permettant une production maximale de TAPS en utilisant une nouvelle souche de Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131), caractérisé en ce que la fermentation est une fermentation par lots, et en ce que la composition du  
35 milieu YMgl comprend 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure,

0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 8,0~12,0% (poids/volume) de glycérol contenant 5~15 mmoles de  $\text{CaCl}_2$  et 0,4~0,7% (poids/volume) de citrate.

Le but de la présente invention est encore de fournir le procédé  
5 permettant une production maximale de TAPS en utilisant une nouvelle souche de Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131), caractérisé en ce que la fermentation est une fermentation par lots alimentés, et en ce que la composition du milieu YMgl comprend 0,3~0,5% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,3~0,5% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7%  
10 (poids/volume) de peptone, 15,0~18,0% (poids/volume) de glycérol contenant 10~20 mmoles de  $\text{CaCl}_2$  et 0,5~0,9% (poids/volume) de citrate.

La figure 1 représente la production de TAPS dans une fermentation par lots alimentés, utilisant DSCC 7-25.

La nouvelle souche de Pichia ciferrii DSCC 7-25 utilisée dans la  
15 présente invention est isolée selon les procédés suivants qui ne comprennent aucune étape de mutagénèse.

La souche parentale de levure diploïde Pichia ciferrii ATCC-14091 est cultivée dans le milieu YMgl [0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7%  
20 (poids/volume) de peptone, 2,5~3,5% (poids/volume) de glycérol] sous agitation, et est étalée dans le milieu de sporulation [3~7% d'extrait de malt et 4~5% de gélose]. Ensuite, on obtient des spores en forme de chapeau, puis on sélectionne les spores uniques par choc thermique et à l'aide d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, telles que la glucylase ou  
25 Zymolyase, qui hydrolysent la paroi cellulaire des cellules végétatives mais pas celle des spores. Ce traitement enrichit efficacement les spores à partir des cultures cellulaires sporulées, et en particulier, à partir des cultures cellulaires faiblement sporulées. Pour la sélection des dérivés de levure à spore unique obtenus, les cellules sélectionnées sont cultivées dans le milieu  
30 YMgl en boîte [0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 2,5~3,5% (poids/volume) de glycérol et 2~30 mmoles d'EGTA], puis les cellules sont sélectionnées suivant la quantité de sphingolipides libérés. Enfin, on isole Pichia ciferrii DSCC 7-25 comme étant la cellule qui libère  
35 le plus de sphingolipides comparée aux autres cellules d'après l'analyse par

CCM et par HPLC. Ces isolats ont été déposés auprès du Korean Culture Center of Microorganism sous le numéro d'ordre KCCM-10131.

Ce qui suit décrit des procédés de fermentation pour produire TAPS à l'aide de la levure Pichia ciferrii DSCC 7-25 sélectionnée.

5 La levure Pichia ciferrii DSCC 7-25 sélectionnée estensemencée dans le milieu de culture. puis on obtient des cellules concentrées. Les cellulesensemencées sont cultivées dans le milieu YMgl avec la souche de levure jusqu'à ce que la concentration maximale de TAPS dans le milieu de fermentation atteigne 5~7 g/l. En outre, la composition du milieu YMgl  
10 comprend 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 8,0~12% (poids/volume) de glycérol contenant 5~15 mmoles de  $\text{CaCl}_2$ , 0,4~0,7% (poids/volume) de sérine et 0,4~0,7% (poids/volume) de citrate.

La formation de sphingolipides est régulée par la concentration en  
15 cation calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) car l'activité de la sérine-palmitoyl-transférase (SPT) est stimulée par l'addition de cation calcium dans le milieu. Cependant, dans le cas de Pichia ciferrii NRRL Y-1031, la production de sphingolipides diminue quand on ajoute du cation calcium dans le milieu.

D'autre part, l'addition de sérine dans le milieu augmente la  
20 production de TAPS, étant donné que les sphingolipides sont biosynthétisés par la réaction entre la sérine et le palmitoyl-CoA. Par conséquent, la sérine est aussi un facteur limitant de la biosynthèse des sphingolipides. Suivant l'addition de cation calcium et de sérine dans le milieu de fermentation, la productivité en TAPS a été augmentée de 4~5 fois comparée à celle en  
25 l'absence de ces composés dans le milieu.

Les conditions de fermentation sont optimales lorsque la température de culture est de 22~28°C et que la vitesse d'agitation du milieu est de 400~600 tours/min. Après la fermentation, la biomasse renfermant les sphingolipides est transférée dans une cuve de vieillissement. Ensuite, la  
30 biomasse fermentée est vieillie pendant 2 jours à 3~5°C. On fait précipiter les cellules et on les fait déposer au fond de la cuve, puis on extrait les sphingolipides à l'aide de solvant organique. Enfin, plus de 95% de TAPS purifiée sont obtenus par chromatographie sur colonne de gel de silice.

La TAPS obtenue peut être convertie en sphingosine ou en  
35 phytosphingosine par désacétylation dans une solution basique telle que

KOH ou NaOH. En utilisant cette sphingosine ou cette phytosphingosine, on peut obtenir le céramide et ses dérivés par une réaction de N-acylation avec un acide gras. L'acide gras utilisé dans cette réaction est un acide gras saturé ou insaturé quelconque ayant 6-40 atomes de carbone et 0-3 doubles liaisons. De plus, cette réaction s'effectue par une réaction enzymatique ou  
5 une réaction chimique. Dans le cas d'une réaction chimique, on peut utiliser comme réactif de liaison le carbodiimide, le carbodiimidazole, la 1,2-dihydroquinolone et/ou l'hydroxybenzotriazole.

Les exemples suivants servent à expliquer de façon plus précise la  
10 présente invention. Toutefois, le cadre de la présente invention ne se limite pas aux exemples suivants.

#### EXEMPLE 1

##### Isolement de Pichia ciferrii DSCC 7-25

15 Une souche diploïde de Pichia ciferrii ATCC-14091 est cultivée dans le milieu YMgl [0,2-0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2-0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3-0,7% (poids/volume) de peptone, 2,5-3,5% (poids/volume) de glycérol] sous agitation à 25°C pendant trois jours. Ensuite, les cellules obtenues sont étalées et cultivées dans 0,1-0,5  
20 ml de milieu de sporulation [3-7% d'extrait de malt et 4-5% de gélose] à la température ambiante pendant 7-10 jours. On obtient alors des spores en forme de chapeau. Le rendement de sporulation est de 6-8%. Les spores obtenues sont enrichies par une combinaison de traitement thermique et de traitement à la Zymolyase pour la sélection. Le traitement thermique est  
25 réalisé sur 1-2 ml de suspension de spores ( $6-10 \times 10^7$  cellules/ml) à 55°C pendant 1-5 minutes et suivi d'un traitement à la Zymolyase 60 000 (10 mg/ml) pendant 0,5 à 2 heures à 30°C. La première sélection est réalisée pour isoler les colonies différentes des cellules parentales au niveau de leur forme, de leur couleur et de leur taille. 50 colonies sont sélectionnées parmi  
30 les 400 colonies cultivées à partir du groupe de spores enrichies.

Pour la deuxième sélection servant à isoler les dérivés de levure à spore unique obtenus, les cellules sélectionnées sont cultivées dans un milieu YMgl en boîte [0,2-0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2-0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3-0,7% (poids/volume) de  
35 peptone, 2,5-3,5% (poids/volume) de glycérol et 2-30 mmoles d'EGTA] à

25°C pendant 4 jours. Ensuite, les cellules sont sélectionnées selon la quantité de sphingolipides libérés. Le tableau suivant indique la quantité de TAPS produite par les souches secondaires sélectionnées.

5    Tableau 1.    Quantité de TAPS produite par les isolats haploïdes dans le milieu YMgl

Souche	Quantité de TAPS produite (mg/l)
14091	120
2-28	94
7-24	93
7-25	319
7-28	199
7-29	184
7-40	116
7-44	83
F-60-10	241

10    Enfin, on isole Pichia ciferrii DSCC 7-25 comme étant la cellule qui libère le plus de sphingolipides comparée aux autres cellules d'après l'analyse par CCM et par HPLC. Le rendement de production de TAPS par Pichia ciferrii DSCC 7-25 est 30% supérieur à celui de la souche F-60-10 qui est connue pour être la meilleure souche pour la production de TAPS.

15

#### EXEMPLE 2

Comparaison de Pichia ciferrii DSCC 7-25 et de Pichia ciferrii  
F-60-10

20    La productivité en TAPS dans la présente invention est mesurée par rapport à celle de Pichia ciferrii DSCC 7-25. Il est décrit dans ce qui suit les résultats de la comparaison entre Pichia ciferrii DSCC 7-25 et Pichia ciferrii F-60-10.

Tableau 2. Résultats de la comparaison entre Pichia ciferrii DSCC 7-25 et Pichia ciferrii F-60-10

	DSCC 7-25	F-60-10
Temps de doublement (heure)	1,5	3,0
Concentration de biomasse (g/l)	29,7	15
Titre de TAPS (mg/l)	319 <sup>a</sup>	241 <sup>b</sup>
Rendement spécifique en TAPS (mg/gdw)	10,7	16,1
Productivité volumétrique (mg de TAPS/L/H)	4,6	1,7

\* Condition de fermentation: milieu YMgl (3% de glycérol), 25°C, 250 tours/min.

a: le nombre d'heures jusqu'à la fin de la fermentation était de 70 heures

b: le nombre d'heures jusqu'à la fin de la fermentation était de 144 heures.

Comme le montre le tableau ci-dessus, la souche DSCC 7-25 possède une bien meilleure productivité volumétrique grâce à laquelle le coût de production est déterminé.

### EXEMPLE 3

Optimisation des conditions de fermentation pour Pichia ciferrii  
DSCC 7-25 - effet synergique de  $\text{CaCl}_2$  et de la sérine sur la  
production de TAPS

On cultive au préalable la souche haploïde sélectionnée Pichia ciferrii DSCC 7-25 dans le milieu de culture, et on obtient des cellules concentrées. Les cellules obtenues sont cultivées dans le milieu YMgl à 30°C et à 250 tours/min pendant 3 jours. La composition du milieu YMgl comprend 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 2,5~3,5% (poids/volume) de glycérol contenant 10 mmoles du  $\text{CaCl}_2$  et 0,5% (poids/volume) de sérine.

La formation de sphingolipides est régulée par la concentration en cation calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ), car l'activité de la sérine-palmitoyl-transférase (SPT) est stimulée par l'addition de cation calcium dans le milieu. Cependant, dans le cas du groupe d'appariement F-60-10 de *Pichia ciferrii* NRRL Y-1031, la production de sphingolipides diminue si l'on ajoute du cation calcium dans le milieu. Le tableau suivant montre l'effet de l'ion calcium sur la production de TAPS chez *Pichia ciferrii* DSCC 7-25 et *Pichia ciferrii* F-60-10.

Tableau 3. Effet du cation calcium sur la production de TAPS

Souche	Production de TAPS (mg/l)		Effet
	sans $\text{CaCl}_2$	$\text{CaCl}_2$ (10 mM)	
DSCC 7-25	396	744	+1,9
F-60-10	241	43	-5,6

D'autre part, l'addition de sérine dans le milieu augmente la production de TAPS car les sphingolipides sont biosynthétisés grâce à la réaction entre la sérine et le palmitoyl-CoA. Le tableau suivant montre l'effet du cation calcium et de la sérine sur la productivité en TAPS chez *Pichia ciferrii* DSCC 7-25.

Tableau 4. Rendement de production de TAPS

Milieu YMgl +	Rendement de production de TAPS		
	mg/l	mg/gdw	mg/l/h
Néant	284	22,3	3,94
* $\text{CaCl}_2$	816	58,3	11,33
** Sérine	784	54,8	10,88
$\text{CaCl}_2$ + Sérine	1065	88,2	14,79

\*  $\text{CaCl}_2$  10 mM, \*\* Sérine 5 g/l

## EXEMPLE 4

Optimisation des conditions de fermentation pour Pichia ciferrii  
 DSCC 7-25: fermentations par lots et par lots alimentés à l'échelle  
 pilote

5 Les conditions de fermentation sont encore optimisées afin d'obtenir  
 un rendement maximal de production de TAPS dans une fermentation à  
 l'échelle pilote de 500 L. Les conditions optimisées englobent la  
 température de culture qui est de 22~28°C et la vitesse d'agitation du milieu  
 qui est de 200~250 tours/min. De plus, on examine d'autres facteurs  
 10 physiologiques qui influent sur la production de TAPS ainsi que sur la  
 biosynthèse de lipide et on détermine les concentrations et les conditions  
 optimales pour chacun des éléments. Ces éléments englobent le pH, la  
 concentration en ion magnésium et en ion calcium, les acides organiques  
 tels que le citrate.

15

Tableau 5. Rendement de production de TAPS dans des conditions  
 optimisées

Souche	<u>Pichia ciferrii</u> DSCC 7-25	
	Par lots (1)	Par lots alimentés (2)
Mode de fermentation		
Temps de doublement (heure)	1,5	1,5
Concentration de biomasse (g/l)	41,6	85
Titre de TAPS (mg/l)	6206	14000
Rendement spécifique en TAPS (mg/l)	149,2	164,7
Productivité volumétrique (mg de TAPS/L/h)	51,7	129,6

20 Conditions de fermentation: Temp. 25°C, agitation 210 tours/min, aération  
 0.2 vvm et pH initial 7,5.

(1): le nombre d'heures jusqu'à la fin de la fermentation était de 120 heures

(2): le nombre d'heures jusqu'à la fin de la fermentation était de 108 heures.

Etant donné que la production de TAPS par la levure Pichia ciferrii est associée à la croissance, il a été mis en évidence qu'un supplément d'une partie des substances nutritives incluant le glycérol conduit à une accumulation de TAPS et de ses dérivés dans la culture jusqu'à la déplétion des substances nutritives. En utilisant une fermentation par lots alimentés, dans laquelle le glycérol a été ajouté progressivement dans le bouillon de fermentation jusqu'à une concentration de 180 g/l, le rendement de production de TAPS et de ses dérivés obtenu a atteint 14 g/l, comme le montrent le tableau 5 et la figure 1.

Après la fermentation, la biomasse renfermant les sphingolipides est transférée dans une cuve de vieillissement. Ensuite, la biomasse fermentée est vieillie pendant 2 jours à 3-5°C. On fait précipiter les cellules et on les fait déposer au fond de la cuve, puis on extrait les sphingolipides par un procédé qui est pratiquement le même que celui publié par Wickerham et coll., (1962). Enfin, on obtient plus de 95% de TAPS purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice.

## Références

1. Wickerham L.J. (1951) U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. N° 1029, p. 56
2. Wickerham L.J. et Burton K.A. (1954) J. Bacteriol. 67: 303-308
- 5 3. Wickerham L.J. et Stodola F.H. (1960) J. Bacteriol. 80: 484-491
4. Stodola F.H. et Wickerham L.J. (1960) J. Biol. Chem. 235 (9):  
2584-2585
5. Barenholz Y., Edelman I. et Gatt S. (1971) *Biochem. Biophysic. Acta*  
248: 458-465.
- 10 6. DiMari S. J. et coll. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143: 553-565
7. Barenholz Y., Gadot N. et Gatt S. (1973) *Biochem. Biophysic. Acta*  
306: 341-345.
8. Maister H.G. et coll. (1962) Appl. Microbiol. 10: 401-406.

### REVENDECATIONS

1. Procédé pour une production maximale de TAPS, utilisant une nouvelle souche de Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131), comprenant les étapes de:
- i) fermentation avec la souche de levure jusqu'à ce que la concentration maximale de TAPS dans le milieu de fermentation atteigne 5~15 g/l, dans laquelle
    - a) la composition du milieu YMgl comprend de l'extrait de levure, de l'extrait de malt, de la peptone, du glycérol contenant du  $\text{CaCl}_2$  et du citrate;
    - b) la température de culture est de 22~28°C;
    - c) la vitesse d'agitation du milieu est de 400~600 tours/min;
  - ii) transfert de la masse de fermentation dans une cuve de vieillissement;
  - iii) séparation de la TAPS à l'aide de solvant organique; et
  - iv) purification de la TAPS par chromatographie sur colonne de gel de silice.
2. Procédé pour une production maximale de TAPS utilisant une nouvelle souche de Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131) selon la revendication 1, dans lequel la fermentation est une fermentation par lots, et la composition du milieu YMgl comprend 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 8,0~12,0% (poids/volume) de glycérol contenant 5~15 mmoles de  $\text{CaCl}_2$  et 0,4~0,7% (poids/volume) de citrate.
3. Procédé pour une production maximale de TAPS utilisant une nouvelle souche de Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131) selon la revendication 1, dans lequel la fermentation est une fermentation par lots alimentés, et la composition du milieu YMgl comprend 0,3~0,5% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,3~0,5% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 15,0~18,0% (poids/volume) de glycérol contenant 10~20 mmoles de  $\text{CaCl}_2$  et 0,5~0,9% (poids/volume) de citrate.

4. La levure sélectionnée Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131).

5. Procédé d'isolement de nouvelles descendance haploïdes de la souche parentale sporulée de Pichia ciferrii ATCC 14091, dont est isolée la levure Pichia ciferrii DSCC 7-25 (KCCM-10131), ledit procédé comprenant les étapes :

- i) de mise en culture de la levure parentale diploïde Pichia ciferrii ATCC 14091 dans le milieu YMgl [0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 2,5~3,5% (poids/volume) de glycérol] sous agitation:
- ii) d'étalement dans le milieu de sporulation [3~7% d'extrait de malt et 4~5% de gélose];
- iii) d'obtention de spores uniques en forme de chapeau et de sélection des spores par l'intermédiaire d'un procédé d'enrichissement qui consiste en un choc thermique et un traitement à la Zymolyase;
- iv) de mise en culture des cellules sélectionnées dans le milieu YMgl en boîte [0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de levure, 0,2~0,4% (poids/volume) d'extrait de malt, 0,3~0,7% (poids/volume) de peptone, 2,5~3,5% (poids/volume) de glycérol et 2~30 mmoles d'EGTA];
- v) de sélection des cellules selon la quantité de sphingolipides libérés; et
- vi) d'isolement de Pichia ciferrii DSCC 7-25 comme étant la cellule qui libère le plus de sphingolipides d'après l'analyse par CCM et par HPLC.

1/1

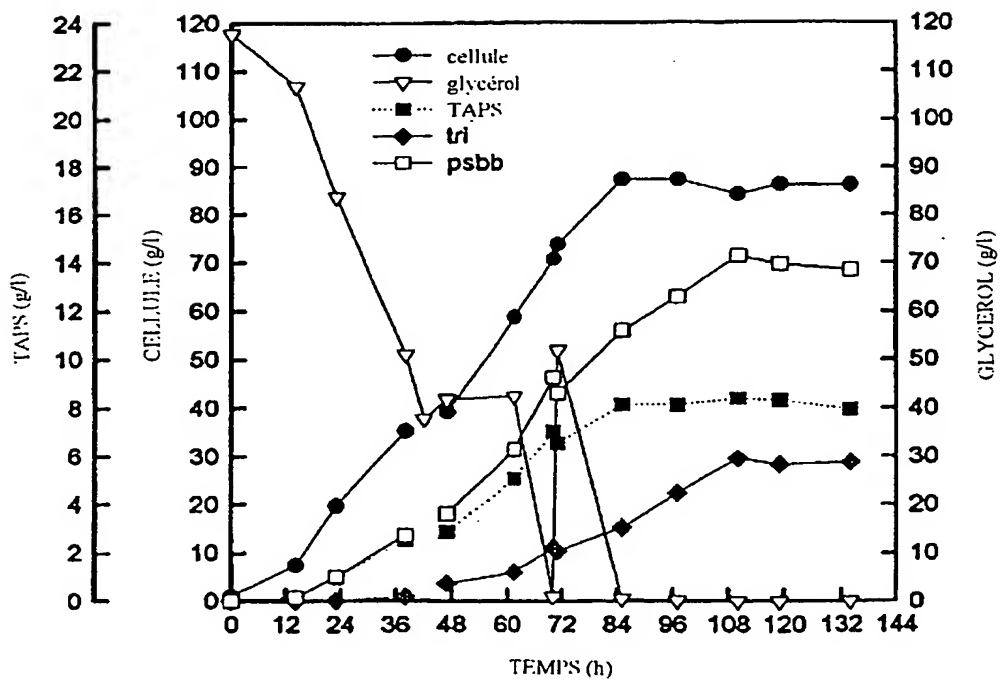


FIG. 1

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2781502

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 562242  
FR 9809516

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP 0 688 871 A (QUEST INTERNATIONAL B.V.) 27 décembre 1995 * page 2, ligne 40 - page 4, ligne 9; exemples *	1-5
D,A	WO 95 12683 A (GIST-BROCADES N.V.) 11 mai 1995 * page 5, ligne 5 - page 6, ligne 35 * * page 7, ligne 11 - page 8, ligne 19; exemples *	1-5
D,A	WO 94 10131 A (QUEST INTERNATIONAL B.V.) 11 mai 1994 * page 3, ligne 1 - page 5, ligne 29 * * page 6, ligne 15 - ligne 20; exemple 2 *	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12P C12N C12R
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 mars 1999		Montero Lopez, B
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)